

## miRNA RT Kit ( Stem-loop)

货号：DN2217-01

规格：100 次

保存：-20 °C

### 【产品简介】

miRNA RT Kit 是采用茎环法原理的专用试剂盒，5 × miRNA Reaction Mix 为一管式反转录预混 Mix，含有反转录所需的所有试剂（script H<sup>-</sup> RTase、RNase Inhibitor、dNTP Mixture、Buffer），只需加入模板 RNA 和茎环引物即可进行反应，使得 cDNA 的合成更加的方便快捷。本试剂盒中使用了具有 DNA 分解活性的特殊 gDNA Remover，只需一步操作，即可同时完成基因组清除与逆转录反应，简化了操作步骤，避免了复杂加样过程造成的样品污染与 RNA 降解的风险。本制品中的组分 script H<sup>-</sup> RTase 具有极高的热稳定性，配以针对优化的缓冲体系，最大限度保证各种 miRNA 特异性逆转录产物的合成。

### 【产品组分】

| 货号         | 组分                       | 体积     |
|------------|--------------------------|--------|
| DN2217-101 | 5 × miRNA Reaction Mix   | 400 μl |
| DN2217-102 | gDNA Remover             | 100 μl |
| DN2217-103 | DEPC-dd H <sub>2</sub> O | 1.5 ml |

### 【保存条件】

-20 °C 恒温保存，有效期 12 个月。

### 【引物选择】

1. 通用茎环结构序列推荐序列：5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGAC- 3' 。
2. 茎环尾加碱基（和 miRNA 3' 互补碱基）长度一般为 5-8 个碱基，本公司建议新手起始首尾加互补碱基为 6 个碱基。逆转录引物只需根据 miRNA 序列在茎环序列上添加 6 个碱基即可。
3. 配套通用下游引物序列：5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTATT- 3' 。
4. 茎环引物设计软件可以采用任意商业化的设计软件。

### 【使用方法】

一、茎环法 miRNA 第一链 cDNA 合成 (以 20 μl 反应体系为例，也可以采用 10 μl 反应体系)

1. 解冻各组分，使用前将每种溶液轻弹或者轻微涡旋振荡混匀，可简短离心以收集残留在管壁的液体到管底。
2. 在 RNase free 管里面加入以下成分：（建议使用 PCR 管冰上配制，置 PCR 仪反应）

| Components                  | Volume        |
|-----------------------------|---------------|
| Total RNA/miRNA             | Up to 2μg *   |
| Stem loop primer (2μM)      | 1 μl          |
| 2 × miRT Reaction Mix       | 4 μl (见注意事项3) |
| gDNA Remover                | 1 μl (见注意事项3) |
| RNase free H <sub>2</sub> O | 补足至 20 μl     |

\* 在反应中使用的total RNA 必须包含有小分子RNA(miRNA)。此过程也可以使用富集的 miRNA， 单纯miRNA无法直接用分光光度计定量，建议直接加入2μl ~5μl。可根据目的miRNA丰度决定加入量，但是对于低丰度miRNA 样品而言(如血清血浆提取物)，可直接加入最大体积8 μl。

3. 移液器轻轻吹打混匀，按下列条件进行第一链cDNA合成反应：

|       |        |
|-------|--------|
| 25°C  | 5 min  |
| 50°C* | 15 min |
| 85°C  | 5 sec  |

\* 如果模板具有复杂二级结构或高GC区域，可尝试将反应温度提高至55° C有助于提高产量。得到的cDNA产物可立即用于qPCR反应，或在-20° C 保存，并在半年内使用；长期存放建议分装后在-70° C保存。cDNA应避免反复冻融。

二、 RT-qPCR 取适量反转录cDNA产物（一般不超过qPCR反应体积的1/10）作为qPCR模板，按照qPCR试剂说明书（迪宁货号：DN2058）进行下一步荧光定量PCR。如果表达基因含量丰富，可以根据实际适当稀释cDNA模板使用。如果茎环引物按照推荐设计，则配套通用下游引物序列：5'-AGTGCAGGTCCGAGGTATT- 3'

#### 【注意事项】

1. 避免 RNase 污染。
2. 为保证反转录成功建议使用高质量的 RNA 样品。
3. 5×miRNAReaction Mix 和 gDNA Remover 含甘油较粘稠，用前请点甩离心后使用，避免吸头外壁沾附损失。5×miRNAReaction Mix 和 gDNA Remover 内的含酶量较足，每次反应 5×miRNAReaction Mix 按照 3.6 μl-3.8 μl 使用，gDNA Remover 按照 0.8 μl-0.9 μl 不会影响使用效果。

#### 【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，承诺为您更换等量合格产品，本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。